บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

ดี(+)กลูโคสโมโนไฮเดรต (D(+)Glucose monohydrate) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

คอปเปอร์ซัลเฟต($CuSO_4.5H_2O$) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของบริษัท Fluka Chemica, Switzerland

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมออกซาเลต ($C_2Na_2O_4$)ของ บริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) ขนาด 300 centripois (cps.) ของบริษัท Nakarai Co.,Ltd., Japan และโซเดียมอัลจิเนตสำหรับการตรึงเซลล์ ของบริษัท Fluka Chemica, Switzerland

โซเดียมอาร์ซิเนต ($Na_2HAsSO_4.7H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd., England

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$)ของบริษัท BDH laboratory Chemicals Ltd., England

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4)ของบริษัท May and Baker Ltd., England

โปตัสเซียมโซเดียมทาร์เทต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd., England

พีจีโอ เอนไซม์ (PGO enzymes) ของบริษัท Sigma Diagnostics, U.S.A.

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals Ltd., England

แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4.7H_2O$)ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

แมงกานีสซัลเฟต($MnSO_4.4H_2O$)ของบริษัท May and Baker Ltd., England

ไดอะนิซิดีนไดไฮโดรคลอไรด์ (o-dianisidine dihydrochloride) ของบริษัท Sigma Dianostics, U.S.A.

แอมโมเนียมออกซาเลต($(COONH_4)_2.H_2O$)ของบริษัท May and Baker Ltd., England

แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$)ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)ของบริษัท Ajax Chemicals, Australia

2. อุปกรณ์

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc., U.S.A.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (uv-visible recording spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan

ตู้อบแห้ง(hot air oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert GmbH, Germany

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) รุ่น o-270 ของบริษัท Memmert GmbH, Germany

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Shinishi Kinoshita, Hokkaido University,Japan

เครื่องพ่นอากาศ (air pump) รุ่น 0522 V4B G21DX ของบริษัท Gast Manufacturing Corporation, U.S.A.

เครื่องปั๊มแบบเพอริสตอลติก (peristaltic pump) รุ่น 2-6201 ของบริษัท Buchler Instruments, U.S.A.

เครื่องกวน (stirrer) รุ่น PC-351 ของบริษัท Corning, U.S.A.

เข็มฉีดยา ขนาด 18Gx1-1/2" 1.25 x 38 มิลลิเมตร ของบริษัท Saejoo medical industry Co., Japan

แผ่นกรองอากาศ (air filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Gelman Sciences Inc., U.S.A.

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด(scanning electron microscope) รุ่น JSM-35CF ของบริษัท JEOL, Japan

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (airflow meter) KOFLOC รุ่น RK-1050, Japan

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD 300 และชุดควบคุมภาวะของบริษัท L.E.Marubishi Co.,Ltd., Japan

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *Aspergillus* sp.G153 ที่คัดเลือกจากดินหลายแหล่งในประเทศไทย พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้ผลิตกรดอินทรีย์ชนิดกลูโคนิคเพียงชนิดเดียว (กรรณิกา จันทรสอาด,2530)

2. การเก็บรักษาจุลินทรีย์

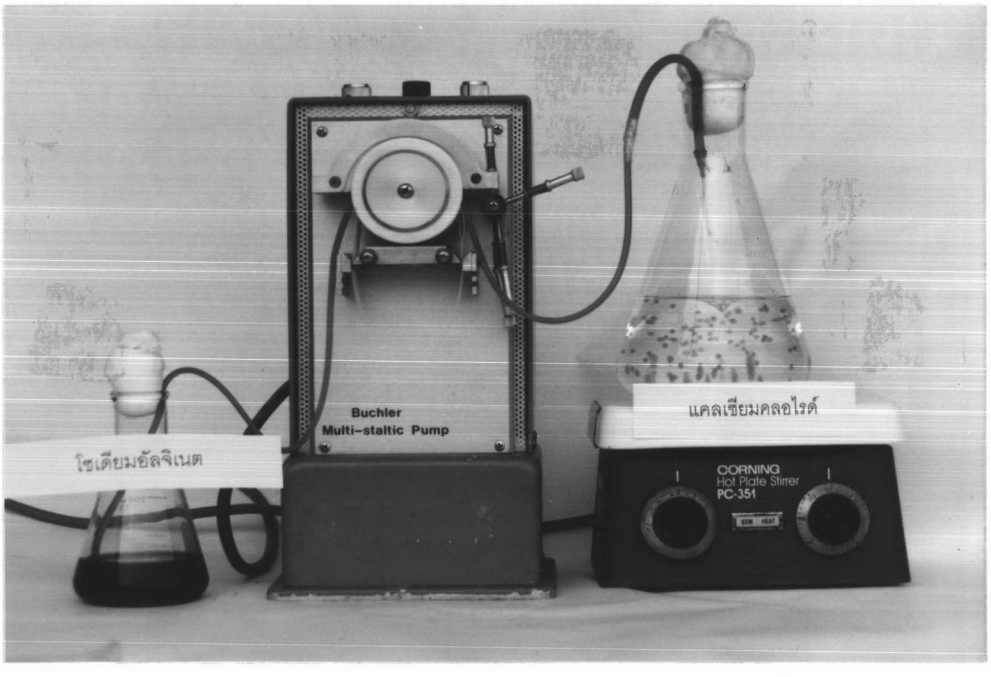
เชื้อสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus* sp.G153 โดยใช้เข็มเขี่ยลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเดกซ์โตรส (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมสปอร์แขวนลอย

ถ่ายสปอร์ของ *Aspergillus* sp. G153 ลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเดกซ์โตรส บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(30-33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 5-7 วัน เติมน้ำกลั่นผสมทวีน 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยและผสมให้เข้ากันเพื่อใช้เป็นสปอร์แขวนลอยในการทดลองต่อไป

4. การตรึงสปอร์

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีการในข้อ 3 ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 1.0-2.5x10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตรหรือแปรผันตามการทดลอง โดยนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรึงสปอร์ของราที่ได้ในแคลเซียมอัลจิเนต โดยเติม 1 มิลลิลิตรของสปอร์แขวนลอยลงในโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่วกัน ดูดสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ผสมสปอร์แขวนลอย ผ่านเครื่องปั๊มแบบเพอริสตอลติกไปตามสายยางซึ่งปลายต่อกับเข็มฉีดยาด้วยอัตรา 2 มิลลิลิตรต่อนาที หยดลงใน 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ซึ่งถูกกวนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน จะได้เม็ดเจลสปอร์ตรึง หลังจากนั้นแยกเม็ดเจลสปอร์ตรึงออกโดยการกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 4 ชะเม็ดเจลสปอร์ตรึงด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 ครั้งและล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 2 ครั้ง นำเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้มาทำให้งอกเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 การตรึงสปอร์ *Aspergillus* sp.G153 ในแคลเซียมอัลจิเนต

5. การเตรียมหัวเชื้อสายใยตริง

เพาะเลี้ยงเม็ดเจลสปอร์ตริงของเชื้อ *Aspergillus* sp.G153 ที่เตรียมได้จากวิธีการในข้อ 4 ปริมาณ 12 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.08 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)หรือตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง โดยบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที แปรผันเวลาในการผลิตสายใยตริงต่างๆ กันตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง นำเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้มาใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิคต่อไป

6. การเตรียมหัวเชื้อสายใยอิสระ

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีการในข้อ 3 ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 1.2-2.5x10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์อิสระงอก (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอกและใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป (บาจรีย์ จันทราภาณุกร, 2536)

7. การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงของ *Aspergillus* sp.G153 ในระดับขวดเขย่า

ถ่ายเม็ดเจลสายใยตริงหนัก 2 กรัม หรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่1 (ภาคผนวก ก) หรือสูตรที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่างกันตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 7 วันหรือจนได้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงสุด

8. การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp.G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column)

8.1 การเตรียมคอลัมน์แก้ว

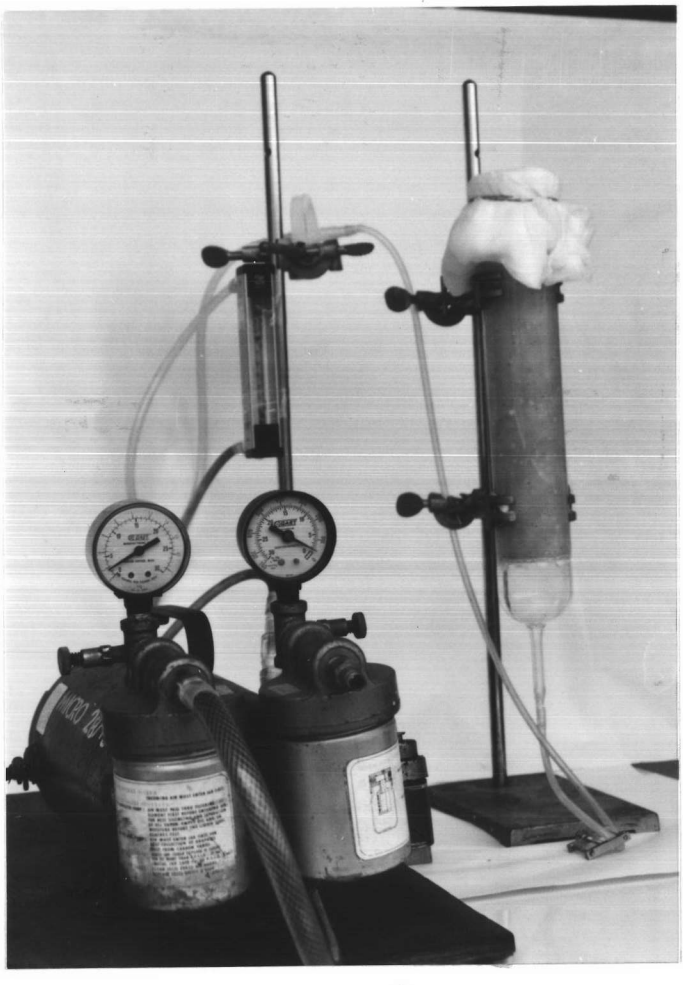
ยึดคอลัมน์แก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ปริมาตรใช้งาน 400 มิลลิลิตร กับขาตั้งเหล็กโดยให้คอลัมน์ทำมุม 90 องศากับแนวราบ ด้านล่างของคอลัมน์แก้วมีแผ่นกรองกระจายอากาศซินเตอร์กลาส (sintered glass) ซึ่งทำหน้าที่รองรับสายใยตรึงที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์แก้ว และเป็นตัวกระจายอากาศเข้าสู่คอลัมน์แก้ว ปลายล่างสุดของคอลัมน์แก้วต่อเข้ากับแผ่นกรองอากาศ (air filter) และเครื่องพ่นอากาศ (air pump) ตามลำดับ โดยสายยางซิลิโคน (silicone tube) เมื่ออากาศผ่านเข้าคอลัมน์แล้วจะออกสู่ภายนอกทางด้านบนของคอลัมน์แก้วซึ่งมีจุกสำลีปิดอยู่ (รูปที่ 3)

8.2 การผลิตกรดกลูโคนิค

นำสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp. G153 มาผลิตกรดกลูโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) หรือสูตรที่ระบุในแต่ละการทดลองปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่เตรียมตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 8.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) โดยแปรผันความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึงและอัตราการให้อากาศตามที่ระบุแต่ละการทดลอง

9. การผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp.G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 6 ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมัก (fermentor) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.50 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิคและการใช้น้ำตาลกลูโคสทุก 3 ชั่วโมงจนสิ้นสุดการทดลอง (บาจรีย์ จันทราภาณุกร, 2536)



รูปที่ 3 การผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

10. การเก็บเกี่ยว (harvest) กรดกลูโคนิค

แยกเม็ดเจลสายใยตริงของ *Aspergillus* sp.G153 จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 4 นำน้ำใสที่ได้ไปตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค ปริมาณน้ำตาลที่เหลือตามวิธีการทดลองข้อ 11 และ 12 ส่วนสายใยตริงนำไปหาการเติบโตตามวิธีการทดลองข้อ 13

11. การวิเคราะห์กรดกลูโคนิค

11.1. การวิเคราะห์กรดกลูโคนิค โดยใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่ละลาย (Takao,1965)

นำน้ำหมักซึ่งได้กรองแยกสายใยตริงออกแล้วตามวิธีการทดลองในข้อ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที กรองเก็บตะกอนที่ได้ด้วยกระดาษกรองโตโย เบอร์ 5 ซี (Toyo filter paper No.5 C) ล้างตะกอนด้วยน้ำปลอดประจุ ละลายตะกอนจนหมดด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) กรองแยกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตทิ้ง นำสารละลายกรดออกซาลิกที่ได้ไปไตเตรตด้วยสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตเข้มข้น 0.1 นอร์มัลแล้วคำนวณหาปริมาณกรดกลูโคนิคโดยคิดจากน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น (ภาคผนวก ค)

11.2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันเกลือกลูโคเนตที่สร้างขึ้นโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 ด้วยเครื่อง HPLC

ล้างตะกอนเกลือแคลเซียมกลูโคเนตที่สร้าง โดยสายใยตริงของ *Aspergillus* sp. G153 ด้วยน้ำเย็นปลอดประจุ 3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งในตู้อบ 80 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนแคลเซียมกลูโคเนต 1 กรัมในน้ำปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบชนิดของเกลือกลูโคเนตด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโต-กราฟฟี (Shimadzu-LC-3A) โดยใช้ Zorbax-C8 (L-3555) คอลัมน์ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร ของบริษัท Dupont มี 20 มิลลิโมลาร์กรดฟอสฟอริก พีเอช 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ 210 นาโนเมตร

12. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

12.1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

โดยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi,1952)

เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาทีแล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว เติมสารละลายเนลสัน (Nelson reagent) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

12.2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ใช้ระบบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสร่วมกับกลูโคสออกซิเดส (Peroxidase and Glucose oxidase : PGO enzymes) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต (Sigma Chemical Company, 1980) ดังนี้

เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาปริมาณกลูโคสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

13. การหาการเติบโตของสายใยตริง

นำเม็ดเจลสายใยตริงของเชื้อรา *Aspergillus* sp.G153 ที่ได้จากการกรองในข้อ 10 มาทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งของเม็ดเจลสายใยตริง หาน้ำหนักแห้งของสายใยตริงโดยหักน้ำหนักแห้งของเม็ดเจลออกจากน้ำหนักแห้งของเม็ดเจลสายใยตริง

14. การตรวจการเติบโตของสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron microscope :SEM)

นำเม็ดเจลสายใยตริงมาตรวจการเติบโตของสายใยตริงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด(Scanning Electron Microscope, JEOL Model JSM-35CF, Japan)โดยตรวจการเติบโตของสายใยบริเวณผิวของเม็ดเจลทั้งเม็ด ตรวจการเติบโตของสายใยภายในเม็ดเจลโดยผ่าครึ่งเม็ดเจลและตรวจการเติบโตของเม็ดเจลที่ผ่าเป็นแว่น ตัวอย่างที่นำมาตรวจได้แก่ เม็ดเจลสายใยตริงที่ทำให้งอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอกนาน 66 ชั่วโมง เม็ดเจลสายใยตริงที่ได้หลังการผลิตในอาหารสูตรที่ 2 1 ครั้ง เม็ดเจลสายใยตริงที่ได้หลังการผลิตซ้ำครบ 6 ครั้ง (ผลิตครั้งที่ 1ใช้อาหารสูตรที่ 2 ผลิตซ้ำที่ 2-6 ใช้อาหารสูตรที่ 2 ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

1. แช่ตัวอย่างในน้ำยาดองขั้นแรก (primary fixative) ซึ่งประกอบด้วย 4 เปอร์เซนต์ ของพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (p-formaldehyde) ใน 0.1โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-18 ชั่วโมง นำมาล้างใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ในน้ำยาดองขั้นที่สอง (secondary fixative) ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซนต์ของออสเมียมเตตระออกไซด์ (Osmium tetraoxide,OsO_4)ใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายใต้ตู้ดูดควัน

2. การขจัดน้ำออก (dehydration)โดยเทน้ำยาดองขั้นที่ 2 ออกแล้วจุ่มตัวอย่างใน 35 50 70 95 และ 100 เปอร์เซนต์ เอทธานอล ขั้นตอนละ 10 - 20 นาที ตามลำดับ

3. นำตัวอย่างมาทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical point dryer, Model SAMDRI - 780)

4. นำตัวอย่างไปติดบนแท่นทองเหลืองด้วยกาวติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (Electro-conductive adhesive)

5. นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร ในเครื่อง Ion Sputter Coater, Model JSC - 110, Japan

6. นำตัวอย่างไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

(หมายเหตุ : การเตรียมตัวอย่างและการตรวจการเติบโตของสายใยตริงใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

15. การหาภาวะที่เหมาะสมในการตริงสปอร์และการเพาะเลี้ยงสายใยตริง

15.1.การหาชนิดและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมในการตริงสปอร์

ตริงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 ความหนาแน่น 1.0-2.5x10^9 สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร ตามวิธีการทดลองข้อ 4 โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตของบริษัท นาคาราอิ (Nakarai Co.,Ltd.) และบริษัท ฟลูกา (Fluka Chemica) ซึ่งแปรความเข้มข้นเป็น 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้สปอร์ตริงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์อิสระงอก (ภาคผนวก ก) ที่ลดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลงเหลือ 0.8 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 5 นำสายใยตริงมาผลิตกรดกลูโคนิคตามวิธีการทดลองข้อ 7 ตรวจสอบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตได้ตามวิธีการทดลองข้อ 11.1 การใช้น้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 12.1 และการเติบโตของสายใยตริงตามวิธีการทดลองข้อ 13 เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิคเมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตชนิดและความเข้มข้นต่างกัน

15.2.การหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของสปอร์ในการตริง

ตริงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 ในโซเดียมอัลจิเนตชนิดและความเข้มข้นเหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 15.1 คือโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แปรผันจำนวนสปอร์ที่ใช้เป็น 10^8 10^9 และ 10^{10} สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร ทำให้สปอร์ตริงงอกตามวิธีการทดลองข้อ 5 นำสายใยตริงที่ได้มาผลิตกรดกลูโคนิคตามวิธีการทดลองข้อ 7 ตรวจสอบปริมาณกรดกลูโคนิค ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและการเติบโตของสายใยตริง เปรียบเทียบผลผลิตกรดเมื่อใช้ความหนาแน่นของสปอร์ต่างๆกัน

15.3.การหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสายใยตริง

ตริงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 ความหนาแน่น 1.0-2.5x10^9 สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำให้สปอร์ตริงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์อิสระงอก (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน 4.0 กรัมต่อลิตร และสูตร

ดังกล่าวที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 1.2 0.8 0.4 และ 0.2 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรตามวิธีการทดลองข้อ 5 นำสายใยตริงที่ได้มาผลิตกรดกลูโคนิคตามวิธีการทดลองข้อ 7 ตรวจสอบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ได้ ปริมาณน้ำตาลและการเติบโตของสายใยตริง เลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

15.4.การหาช่วงเวลาเหมาะสมในการเตรียมสายใยตริงที่มีประสิทธิภาพสูง

เพาะเลี้ยงสปอร์ตริงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก) ที่ได้จากการทดลองข้อ 15.3 คือใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 5 โดยแปรผันช่วงเวลาในการทำให้สปอร์ตริงงอกตั้งแต่ 10-72 ชั่วโมง นำสายใยตริงที่ได้ในช่วงเวลาต่างๆกันมาผลิตกรดกลูโคนิคตามวิธีการทดลองข้อ 7 เปรียบเทียบผลผลิตกรด ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและการเติบโตของสายใยตริง เลือกเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสายใยตริงประสิทธิภาพสูงสำหรับการทดลองต่อไป

15.5.การหาขนาดของเม็ดเจลสปอร์ตริงที่เหมาะสม

ตริงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 ความหนาแน่น $1.0-2.5 \times 10^{9}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 แปรผันขนาดของเม็ดเจลสปอร์ตริงเป็น 3.5 และ 4.5 มิลลิเมตร ทำให้สปอร์ตริงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการทดลองข้อ 5 เป็นเวลา 66 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสายใยตริงที่มีประสิทธิภาพสูงที่ได้จากการทดลองข้อ 15.4 นำสายใยตริงที่ได้มาผลิตกรดกลูโคนิคตามวิธีการทดลองข้อ 7 เปรียบเทียบปริมาณกรดที่ผลิตได้เมื่อใช้เม็ดเจลสายใยตริงขนาดต่างๆ

16. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้สายใยตริงในระดับขวดเขย่า

16.1. การหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

ผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้สายใยตริงที่ได้จากการทดลองข้อ 15 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยอิสระ (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟต 4.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และในอาหารสูตรดังกล่าวที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2.0 1.2 0.8 0.4 0.2 และ 0 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ใช้ภาวะต่างๆตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 7 ตรวจสอบปริมาณกรดกลูโคนิค การใช้น้ำตาล การเติบโตของสายใยตริง และการเกิดเซลล์อิสระทุกวันจนได้ผลผลิตกรดสูงสุด

16.2. การหาความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค

ผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงที่ได้จากการทดลองข้อ 15 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 16.1 แปรผันปริมาณเม็ดเจลสายใยตริงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ภาวะต่างๆตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 7 เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิคเมื่อใช้ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงต่างกัน

17. การหาภาวะเหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้สายใยตริงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

นำสายใยตริงของ *Aspergillus* sp.G153 มาผลิตกรดกลูโคนิคในคอลัมน์แก้วซึ่งได้จัดเตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 8.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงสูตรที่ 1 ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 250 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยแปรผันภาวะต่างๆดังนี้

17.1. แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นเป็น 200 150 100 และ 50 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

17.2. แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 8 10 และ 12 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

17.3. แปรผันความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึงเป็น 80 200 300 และ 400 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตรวจสอบการผลิตกรดกลูโคนิคตามวิธีการทดลองข้อ 11.1 การใช้น้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 12.2 และระยะเวลาที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด

18. การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้แป้งไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งคาร์บอนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

ใช้แป้งไฮโดรไลเสตชนิดที่กรองเอาแป้งที่ไม่ได้ถูกย่อยสลายออก ซึ่งได้รับจากบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด โดยปรับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสให้เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในคอลัมน์แก้วที่ได้จากการทดลองข้อ 17 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ในการผลิตกรดกลูโคนิคในคอลัมน์แก้ว โดยใช้ภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงที่ได้จากการทดลองข้อ 17 คืออัตราการให้อากาศเท่ากับ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึงเป็น 300 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคและการใช้น้ำตาลกลูโคส กับการใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน

19. การใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการผลิตกรดกลูโคนิค

เพาะเลี้ยงเม็ดเจลสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp.G153ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) ซึ่งได้เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งไฮโดรไลเสตชนิดที่ผ่านการกรองที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุแต่ไม่เติมธาตุต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบการผลิตกรดกลูโคนิคและการใช้น้ำตาลกลูโคส เปรียบเทียบผลผลิตกรดที่ได้เมื่อใช้น้ำประปา

และน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

20.การเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยสายใยตรงและสายใยอิสระของ *Aspergillus* sp.G153

ผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรงและสายใยอิสระ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างตามวิธีการทดลองข้อ 8 และในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมัก (fermentor) (ภาคผนวก ก) ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตรตามวิธีการทดลองข้อ 9 ตามลำดับ โดยใช้ภาวะต่างๆ ดังนี้

ภาวะต่างๆ	สายใยตรง	สายใยอิสระ
- ความเข้มข้นของกลูโคสในแป้งไฮโดรไลเสต (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	50	50
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	0.2	4.0
- ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	12	12
- ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	6.0	6.0
- ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	400	2000
- ขนาดหัวเชื้อ (ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	300 กรัม	70 มิลลิลิตร
- อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที)	10	1.5
- อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิห้อง (30-33)	30±1
- อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	-	500

เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคและการใช้น้ำตาล เมื่อใช้สายใยตรงและสายใยอิสระในการผลิตกรด

21. การทดลองผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ (repeated batch) โดยสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp.G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column)

ผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำด้วยสายใยตรึงเดิม โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดละ 2 การทดลอง

21.1 การทดลองชุดที่ 1 ผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนเหมาะสม

21.1.1 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีแร่ธาตุที่จำเป็นครบ แต่ใช้แป้งไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำรวม 10 ครั้ง เปรียบเทียบปริมาณกรดและการใช้น้ำตาลของแต่ละซ้ำ

21.1.2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) คือสูตรที่ 1 แต่ใช้แป้งไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ใส่แร่ธาตุที่จำเป็น ผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำรวม 10 ครั้ง เปรียบเทียบปริมาณกรดและการใช้น้ำตาลของแต่ละซ้ำ และเปรียบเทียบปริมาณกรดกับข้อ 21.1.1

21.2 การทดลองชุดที่ 2 ผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเหมาะสม แต่ลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

21.2.1 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) ในการผลิตครั้งแรก หลังจากนั้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวแต่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน คือไม่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำในครั้งต่อ ๆไป จนครบ 6 ครั้ง เปรียบเทียบปริมาณกรดและการใช้น้ำตาลของแต่ละซ้ำ

21.2.2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) แต่ไม่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงซ้ำจนครบ 6 ครั้ง เปรียบเทียบปริมาณกรด การใช้น้ำตาลของแต่ละซ้ำ และเปรียบเทียบปริมาณกรดกับข้อ 21.2.1

T 1830737

22. การเปรียบเทียบความสามารถในการงอกของเม็ดเจลสปอร์ตริงที่เก็บไว้ที่เวลาต่างๆกันก่อนนำมาเพาะเลี้ยงให้สปอร์ตริงงอก และประสิทธิภาพของสายใยตริงที่ได้ในการผลิตกรดกลูโคนิค

ตริงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 1.0-2.5x10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามวิธีการทดลองข้อ 4 เก็บเม็ดเจลสปอร์ตริงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 วัน เพาะเม็ดเจลสปอร์ตริงให้งอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการทดลองข้อ 5 นำสายใยตริงมาผลิตกรดกลูโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการทดลองข้อ 7 นาน 8 วัน ตรวจสอบความสามารถในการงอกของสปอร์ตริง เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อใช้เม็ดเจลสปอร์ตริงที่เก็บไว้ที่เวลาต่างๆกันในการผลิต

23. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูโคนิคของสายใยตริงที่เก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน

ตริงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 ตามวิธีการทดลองข้อ 4 ทำให้สปอร์ตริงงอกตามวิธีการทดลองข้อ 5 เก็บสายใยตริงไว้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 วัน นำสายใยตริงมาผลิตกรดกลูโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) นาน 8 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดเมื่อใช้สายใยตริงที่เก็บไว้ที่เวลาต่างๆกันในการผลิต